

## Chez la drosophile, les horloges circadiennes ont leurs propres yeux

**D**es rythmes circadiens (rythmes dont la période est voisine de 24 heures) sont observés chez la plupart des organismes vivants. Ils touchent des fonctions physiologiques et comportementales des plus variées, telles que des phénomènes d'agrégation cellulaire (algues), de sporulation (moisissures), d'éclosion (insectes) ou d'activité locomotrice et cérébrale (insectes et mammifères). Ces rythmes sont engendrés par des horloges internes dont les oscillations persistent en obscurité constante. Par ailleurs, les horloges circadiennes sont sensibles à la lumière, ce qui permet leur remise à l'heure quotidienne par les cycles jour/nuit que la rotation de la terre nous impose.

### Il n'y a pas qu'une horloge

Les nombreux rythmes physiologiques d'un organisme dépendent-ils d'une horloge en chef imposant sa cadence à des horloges « esclaves » spécialisées, ou émanent-ils d'oscillateurs indépendants? Une étude réalisée chez la drosophile [1] nous montre que les différents organes de cet insecte contiennent des horloges circadiennes autonomes. En outre, ces horloges peuvent être remises à l'heure par la lumière, dévoilant des propriétés de photoréception insoupçonnées jusqu'alors dans ces organes. La taille minimale de la structure tissulaire capable d'engendrer un rythme circadien a fait l'objet de nombreux débats. La mise en évidence de rythmes circadiens chez des organismes unicellulaires (bactéries, moisissures) indique qu'une cellule unique est capable de constituer une horloge fonctionnelle. Par ailleurs,

des rythmes circadiens d'activité électrique ont été mesurés sur des neurones isolés, à partir de la rétine chez une limace de mer [2] ou des noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus chez le rat [3].

Chez la drosophile, une horloge circadienne gouvernant le rythme d'activité locomotrice a été localisée dans le cerveau [4]. Un rythme d'éclosion est également observé dans cette espèce, mais les tissus responsables de l'établissement du rythme restent inconnus. Les études moléculaires ont montré l'importance d'un système d'autorégulation négative impliquant les gènes *period* (*per*) et *timeless* (*tim*) dans la production de ces rythmes. Les protéines PER et TIM s'accumulent au cours de la nuit, subissent des modifications post-traductionnelles, et s'associent pour former un complexe qui est transféré dans le noyau où il intervient probablement dans la répression des gènes *per* et *tim*. Ce cycle moléculaire pourrait constituer le mécanisme de comptage du temps circadien. Lorsque de la lumière est perçue par la mouche, la protéine *timeless* est rapidement dégradée et cette baisse brutale de la quantité de protéine déplace le cycle, imposant ainsi une nouvelle phase à l'horloge (pour revue voir [5]).

### Où l'on suit la sensibilité à la lumière du gène *per* en dehors du cerveau

L'absence de rythme physiologique mesurable n'avait pas permis jusqu'alors de tester l'autonomie et les propriétés des horloges présomptives éparpillées dans le corps de la drosophile, et repérées par la présence de la protéine PER. Des pre-

miers travaux avaient mis en évidence des fluctuations circadiennes des quantités de protéines PER et TIM dans les tubules de Malpighi (une structure fonctionnellement équivalente aux reins) chez des mouches préalablement décapitées [6]. Ces fluctuations persistent dans l'obscurité constante et sont remises à l'heure par une inversion des cycles jour/nuit. Ainsi, une horloge circadienne indépendante de la tête et du système visuel peut fonctionner et percevoir les cycles jour/nuit dans le corps des drosophiles. Afin de suivre l'expression rythmique du gène *per* dans un tissu en culture ou chez une mouche vivante, des mouches transgéniques ont été construites qui portaient un élément transposable contenant les régions régulatrices de *per* fusionnées au gène codant pour la luciférase. La mesure de la bioluminescence émise par la luciférase sous contrôle de *per* permet de suivre les oscillations transcriptionnelles du gène *per* *in vivo* dans la culture, ou dans l'animal entier grâce à la forte expression de *per* dans l'œil [7]. Par cette technique, un oscillateur circadien sensible à la lumière a été observé dans des cultures de glandes prothoraciques pupales (elles synthétisent l'ecdysone, une hormone stéroïde impliquée dans la métamorphose de l'insecte) [8].

Les résultats obtenus par les groupes de S. Kay (La Jolla, CA) et J. Hall (Waltham, MA) aux États-Unis établissent d'une façon définitive l'autonomie des oscillateurs extracérébraux de la mouche et leur capacité intrinsèque de percevoir la lumière [1].

Les chercheurs ont mis en culture séparément, des têtes, des thorax et des abdomens de drosophiles portant

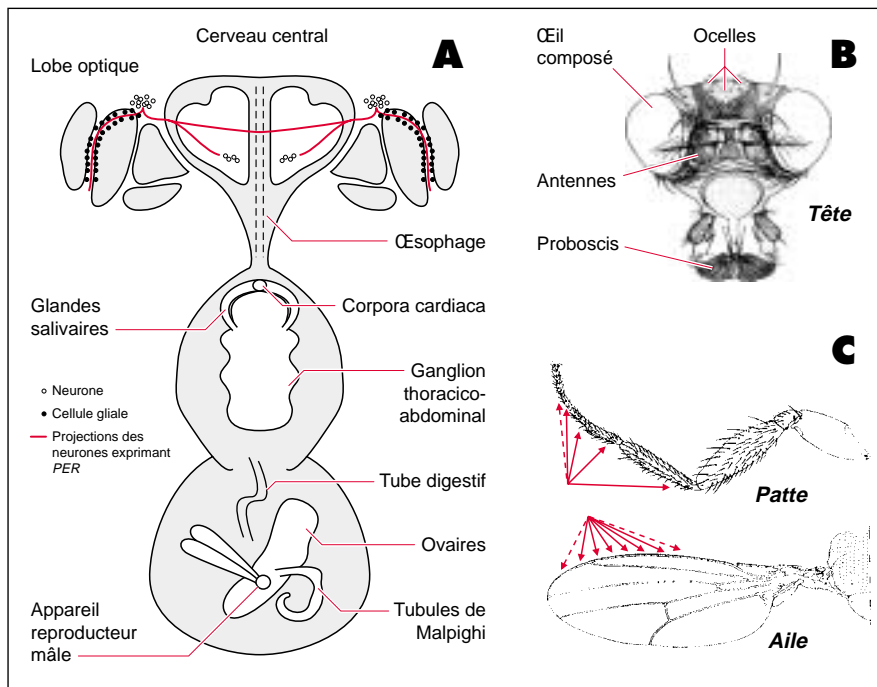


Figure 1. **La localisation des horloges circadiennes chez la drosophile adulte.** Le corps de la drosophile contient de nombreux sites d'expression du gène d'horloge *period*, dans le cerveau, le thorax et l'abdomen (A), ainsi que dans les organes sensoriels de la tête (B). L'étude de Plautz et al. [1] met en évidence de nouveaux sites dans des cellules chimiosensorielles présentes sur les pattes et les ailes des mouches (flèches rouges) (C). En mesurant les oscillations transcriptionnelles du gène *per* par le biais d'un transgène *per-luciférase*, les auteurs peuvent suivre le fonctionnement de ces horloges circadiennes présumées dans des cultures d'organes isolés. Les résultats montrent qu'elles tournent de façon parfaitement autonome, y compris dans leur capacité d'être remises à l'heure par la lumière. (D'après [4] et Flybase.)

un transgène *per-luciférase*, et mesuré la bioluminescence de ces cultures pendant plusieurs jours. Un rythme robuste a été observé en conditions jour/nuit 12/12 (cycles de 12h de lumière et 12 h d'obscurité), avec une phase (la position du pic dans un cycle jour/nuit) identique pour les trois segments. Le rythme persiste en conditions d'obscurité constante, mais s'affaiblit rapidement pour disparaître après deux à quatre jours. Une nouvelle série de cycles jour/nuit décalés de 6 heures par rapport aux premiers, relance les oscillations de bioluminescence avec une nouvelle phase. Cette observation montre la capacité des tissus de percevoir la lumière de façon autonome.

Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus après dissection des drosophiles. Tout d'abord, de nou-

veaux sites d'expression du gène *per* ont été observés, en utilisant le système GAL4 pour introduire le marqueur fluorescent GFP (*green fluorescent protein*) dans les drosophiles. Ce système met à profit la capacité du facteur de transcription de levure GAL4 d'activer de façon spécifique la transcription d'un gène par l'intermédiaire des séquences d'activation UAS. Des mouches portant un transgène codant pour le facteur de transcription GAL4 placé sous le contrôle des régions régulatrices de *per*, et un transgène codant pour la protéine GFP placé en aval de séquences UAS (séquences activant la transcription sous contrôle de GAL4), ont été observées pour la fluorescence de la GFP (*m/s n° 2, vol. 14, p. 240*). S'ajoutant au profil d'expression déjà connu pour le gène *per* chez l'adulte,

une expression de *per* dans des cellules chimiosensorielles localisées sur les pattes et les ailes a été mise en évidence grâce à la résolution du marquage GFP (figure 1). Des cultures de tissus d'ailes et de pattes, ainsi que d'antennes et de proboscis (trompe), ont été analysées pour leur expression du transgène *per-luciférase*. Comme pour les segments entiers de mouches, les cultures d'organes montrent une rythmicité de bioluminescence en conditions jour/nuit qui persiste quelques jours en conditions d'obscurité constante et peut être réentraînée par de nouveaux cycles jour/nuit.

### À quoi peut bien servir la présence d'une horloge circadienne dans tous ces tissus ?

Bien qu'elle ne soit pas limitée à ceux-ci, la présence d'horloges dans les organes sensoriels constitue un fait marquant de l'organisation circadienne chez la drosophile. Le couplage d'une horloge et d'un système sensoriel permettrait d'adapter ce dernier aux variations circadiennes des signaux environnementaux. Plautz et al. [1] rappellent que des variations circadiennes de la sensibilité à la lumière et à la douleur ont été observées chez les mammifères. Des récepteurs des phéromones sexuelles étant localisés sur les pattes des adultes, il est possible que le comportement sexuel des drosophiles soit également influencé par l'horloge circadienne. Quelles que soient les fonctions contrôlées, ces résultats montrent à quel point la mesure du temps circadien est un phénomène décentralisé chez la drosophile : chaque tissu dans lequel on trouve les composants moléculaires de l'horloge se comporte comme un oscillateur autonome, capable de percevoir la lumière.

### Comment les différents tissus perçoivent-ils la lumière ?

Deux questions nouvelles sont posées par cette étude : la perception de la lumière est-elle intrinsèque aux cellules contenant l'assemblage moléculaire de l'oscillateur ? Comment expliquer la persistance du rythme d'activité

locomotrice pendant plusieurs semaines en conditions d'obscurité constante tandis que les oscillations de la bioluminescence *per*-luciférase dans les cultures d'organes disparaissent en quelques jours?

La capacité des différents tissus de percevoir la lumière peut résulter de systèmes photorécepteurs indépendants et en mesure de communiquer les informations lumineuses aux horloges voisines. Une autre possibilité est que les cellules « horloges » soient elles-mêmes équipées d'un système photorécepteur. La découverte d'analogies de séquence entre le gène *per*, et deux gènes impliqués dans le fonctionnement de l'horloge circadienne et la photoréception chez *Neurospora crassa* suggère même un lien très étroit entre horloge et photorécepteurs [9, 10]. La protéine PER contient un domaine impliqué dans les interactions protéine-protéine, le domaine PAS. Celui-ci a été nommé d'après les noms des gènes de drosophile *Per* et *Sim* (*single-minded*) et du gène mammifère *Ahr* codant pour le récepteur de la dioxine, gènes dans lesquels la séquence a été caractérisée pour la première fois (*m/s n° 9, vol. 11, p. 1355*). La signature de ce domaine a été retrouvée dans nombre de gènes eucaryotes et procaryotes, qui semblent partager une implication dans des phénomènes de transduction sensorielle, tels que la photoréception et la sensibilité au potentiel redox ou électrique [11]. Ces données suggèrent une origine commune aux horloges circadiennes et aux photorécepteurs.

La disparition rapide des oscillations de l'expression du transgène *per-luciférase* en conditions d'obscurité

constante pourrait tenir à la nature cellulaire des oscillateurs. Sur ce point, les expériences de Plautz *et al.*, qui ont été réalisées avec des cultures d'organes, ne permettent pas de conclure, et seule une mesure du rythme sur des cellules isolées pourra démontrer l'existence d'une autonomie cellulaire de l'horloge. Si tel est le cas, l'affaiblissement rapide du rythme de bioluminescence pourrait résulter de la totale indépendance des oscillateurs cellulaires contenus dans la culture. En effet, une légère différence de période entre oscillateurs conduit à un décalage de phase rapide entre ceux-ci, qui abolit le rythme général mesuré. Dans cette hypothèse, la disparition du rythme observée en obscurité constante rendrait compte de l'incapacité des oscillateurs individuels de communiquer entre eux ou avec une quelconque horloge maîtresse pour rester en phase. La remise à l'heure de l'ensemble des horloges circadiennes de l'organisme se ferait par l'intermédiaire de la lumière, que les auteurs qualifient de signal de coordination général. La persistance du rythme d'activité locomotrice suggère que l'oscillateur du cerveau, qui en est responsable, est doué de propriétés uniques, qui pourraient être dues à sa nature cellulaire neuronale ■

#### François Rouyer

Institut Alfred-Fessard, Cnrs UPR 2212, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

#### TIRÉS À PART

F. Rouyer.

#### RÉFÉRENCES

1. Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 1997; 278: 1632-5.
2. Michel S, Geusz ME, Zaritsky JJ, Block GD. Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science* 1993; 259: 239-41.
3. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 1995; 14: 697-706.
4. Hall JC. Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci* 1995; 18: 230-40.
5. Couderc JL. Mécanismes moléculaires du fonctionnement et de la remise à l'heure de l'horloge biologique. *Med Sci* 1996; 12: 798-801.
6. Giebultowicz JM, Hege DM. Circadian clock in Malpighian tubules. *Nature* 1997; 386: 664.
7. Stanewsky R, Jamison CF, Plautz JD, Kay SA, Hall JC. Multiple circadian-regulated elements contribute to cycling *period* gene expression in *Drosophila*. *EMBO J* 1997; 16: 5006-18.
8. Emery IF, Noveral JM, Jamison CF, Siwicki KK. Rhythms of *Drosophila period* gene expression in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4092-6.
9. Crosthwaite SK, Dunlap JC, Loros JJ. *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 1997; 276: 763-9.
10. Kay SA. Circadian rhythms – PAS, present, and future: clues to the origins of circadian clocks. *Science* 1997; 276: 753-4.
11. Zhulin IB, Taylor BL. PAS domain S-boxes in Archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 331-3.



RETROUVEZ LES REVUES MASSON SUR INTERNET

<http://www.masson.fr>  
e-mail : [revues@masson.fr](mailto:revues@masson.fr)